

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2025.07.017

基于前表面荧光的活性污泥生化特性解析

李 坦, 邹 康, 余华荣

(广州大学 土木与交通工程学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 活性污泥的耗氧速率(OUR)和底物降解速率是污泥生化特性的重要参数,但其检测步骤繁琐,无法原位实时监测。基于此,采用前表面荧光激发-发射矩阵(FF-EEM)对序批式反应器(SBR)中活性污泥在一个反应周期内的荧光特性进行分析,并对比了OUR与底物降解速率的变化。结果表明,FF-EEM检测到的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)在稳定期和内源呼吸期与底物降解速率的相关性良好(相关系数为0.915 3);在整个周期内,NADH与活性污泥耗氧速率有很好的相关性(相关系数为0.682 0)。因而,有望通过FF-EEM在线监测活性污泥中NADH荧光来分析其生化特性,进而指导工艺的智慧调控。

关键词: 前表面荧光; 活性污泥; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 生化特性; 耗氧速率; 底物降解速率

中图分类号: TU992 文献标识码: A 文章编号: 1000-4602(2025)07-0117-07

Analysis of Biochemical Characteristics of Activated Sludge Based on Front-face Fluorescence

LI Tan, ZOU Kang, YU Hua-rong

(School of Civil and Transportation Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Oxygen uptake rate (OUR) and substrate degradation rate in activated sludge are critical parameters for assessing the biochemical characteristics of activated sludge. However, traditional detection methods are complex and do not allow for in situ monitoring. To address this issue, the fluorescence characteristics of activated sludge in a sequential batch reactor (SBR) over a complete cycle were analyzed using front-face fluorescence excitation-emission matrix (FF-EEM). Additionally, the variations in OUR and substrate degradation rate were examined and compared. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), as detected by FF-EEM, exhibited a strong correlation with substrate degradation rate during both stable and endogenous respiratory periods ($R^2=0.915\ 3$). Throughout the entire cycle, NADH also showed a significant correlation with the OUR of activated sludge ($R^2=0.682\ 0$). Consequently, it is anticipated that FF-EEM can be employed to monitor NADH fluorescence in activated sludge online, thereby facilitating the analysis of biochemical characteristics and guiding the intelligent regulation of the treatment process.

Key words: front-face fluorescence; activated sludge; nicotinamide adenine dinucleotide (NADH); biochemical characteristics; oxygen uptake rate (OUR); substrate degradation rate

活性污泥法中的微生物活性对污水处理效果至关重要。通常,微生物活性采用耗氧速率(OUR)和

底物降解速率来表达^[1-2]。然而,以上参数的测定过程繁琐耗时,无法实现实时反馈。因此,研发能指导污水处理厂污泥运行调节的活性污泥在线监测方法至关重要。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)是活性污泥细胞内参与代谢的一种辅酶,具有荧光特性,其荧光峰强度与浓度成正比,因此可以借助荧光峰强度推断荧光团的浓度,进而实现检测活性污泥的底物降解速率与OUR^[3]。

传统直角样品架荧光检测方法需对活性污泥进行复杂的预处理,其过程繁琐。而前表面荧光检测方法无需预处理,无需激发光、发射光完全穿透样品内部,从而减小了散射和吸光度引起的内滤效应,能够很好地适用于悬浊液体或固体表面荧光直接检测。前表面荧光检测已在食品科学研究领域得到了广泛应用,如牛奶^[4]、蜂蜜^[5]等食品的荧光检测。此外,前表面荧光检测也已应用于水处理,用于分析膜污染^[6]和混凝效率^[7]。其在直接表征浑浊、吸光性强的污泥方面也展现出极大潜力。

平行因子分析(PARAFAC)是一种三向分解方法,其将荧光强度分解成激发波长(λ_{ex})和发射波长(λ_{em}),通过建立模型,把重叠的荧光峰提纯为若干单一组分的荧光图谱,并在归一化后得到某一组分的荧光得分对应于其相对浓度^[3]。由于活性污泥中不同荧光团存在其特定的 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$,不同荧光团的荧光峰通常存在重叠现象,利用PARAFAC方法可将FF-EEM的荧光信号分解为单一组分光谱,对活性污泥进行实时荧光特性分析,从而在无需进行预处理的情况下实现活性污泥悬浊液的原位表征,为原位在线污泥活性表征提供参考。

笔者采用前表面荧光激发-发射矩阵(FF-EEM)对好氧序批式反应器(SBR)中的活性污泥胞外聚合物(EPS)、胞内聚合物(IPS)、可溶性微生物代谢产物(SMP)和未经处理的污泥进行表征,并通过PARAFAC分离FF-EEM中的荧光组分,进一步分析活性污泥生化特性(底物降解速率和OUR)与荧光光谱之间的关系,以验证FF-EEM用于污泥活性原位检测的可行性,旨在为污泥原位实时检测与活性分析提供新思路与新方法。

1 材料与方法

1.1 SBR运行概况

采用SBR开展污泥活性特征与FF-EEM表征实

验,反应器有效容积为5 L,选取广州市沥滘污水处理厂的好氧活性污泥作为接种污泥,初始污泥浓度为3 170 mg/L。实验进水采用人工配水模拟城市生活污水,主要成分包括:葡萄糖(306.75 mg/L)、蛋白胨(115 mg/L)、酵母膏(14 mg/L)、 NaHCO_3 (255.5 mg/L)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (104.75 mg/L)、 KH_2PO_4 (21.75 mg/L)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (32 mg/L)、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2.66 mg/L)、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.125 mg/L)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.25 mg/L)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.703 mg/L)。进水从反应器底部进入,控制容积交换比为50%;采用反应器底部曝气头进行曝气,曝气强度为 $24 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$,溶解氧控制在1.4 mg/L左右;水力停留时间(HRT)为12 h, SBR运行周期包括进水10 min、曝气670 min、静置沉降30 min、排水10 min。通过每天排混合液200 mL的方式控制污泥停留时间为25 d。

往SBR中加入模拟配水,之后正常运行270 min,共三个平行反应周期。前120 min每隔20 min取一次样品,后150 min每隔30 min取一次样品,共36个样品。采样后立即对污泥溶液进行分析。

1.2 污泥各组分的提取及生化特性参数测定

从SBR中取30 mL活性污泥混合液,在4 000 r/min、25 °C条件下离心15 min,取上清液并用0.45 μm 的混合纤维素酯膜过滤,即得SMP溶液。向离心后沉积的污泥中加入等量的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液(0.02 mol/L, pH=7.75)^[8],重新将污泥悬浮于30 mL离心管中,并在12 000 r/min、25 °C条件下离心15 min,取上清液并用0.45 μm 的混合纤维素酯膜过滤,即得EPS溶液。向剩余污泥中补充等量的Tris缓冲液,重新悬浮后将其倒入100 mL的三角瓶中,在80 °C条件下水浴加热30 min,再次将混合液于12 000 r/min、25 °C条件下离心15 min,取上清液通过0.45 μm 的混合纤维素酯膜过滤,即得IPS溶液。此外,按照文献[9]测定COD、OUR、混合液悬浮物(SS)和挥发性悬浮物(VSS)浓度。

1.3 FF-EEM检测及数据分析

活性污泥细胞的荧光通过FF-EEM检测活性污泥悬浊液得到。FF-EEM测定活性污泥过程如下:首先,取3 mL未处理的污泥和污泥提取物(SMP、EPS、IPS)样品装入10 mm石英四通比色皿中,随后将比色皿插入前表面荧光样品架(P/N 204-26836-42),通过三维荧光光谱仪在室温(24 ± 1) °C下进行

测定。 λ_{Ex} 扫描范围设置为250~450 nm,扫描间隔为5 nm; λ_{Em} 扫描范围设置为250~550 nm,扫描间隔为2 nm。 λ_{Ex} 和 λ_{Em} 狭缝宽度均为5 nm。考虑到活性污泥样品正面荧光信号较强,因此设置探测器灵敏度为低(sensitiviting: low),以避免信号饱和。采用高扫描速度,即60 000 nm/min,样品单次扫描时间为52 s。为避免反射光进入发射检测器,发射光以 30° 入射角射向石英比色皿前表面,检测光程及实物样品检测架如图1(a)所示,并使用Thermo Scientific Cimarec小型搅拌器防止污泥发生沉降,如图1(b)所示。

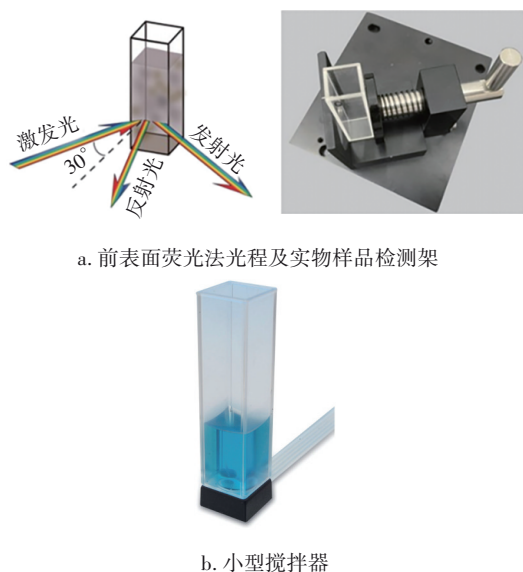


图1 前表面荧光法光程、实物样品检测架及小型搅拌器示意

Fig.1 Schematic diagram of the front-face fluorescence method light path, solid sample detection bracket and small stirrer

FF-EEM能够通过荧光峰强度进行相对定量。通过FF-EEM测量活性污泥悬浊液三维荧光,由于污泥细胞提取物中蛋白质、NADH和腐殖酸类物质的荧光峰存在交叠情况,采用Matlab并结合DrEEM工具包对测定的FF-EEM数据进行PARAFAC分析^[10],将荧光交叠峰区分开,用PARAFAC分析得到的每个荧光组分得分值(score值)来表达各荧光组分的相对浓度。同时,使用OriginPro对FF-EEM测定的NADH荧光得分与OUR、底物降解速率进行回归分析,以探讨其关联性,从而明确FF-EEM在线监测活性污泥中NADH荧光用于分析活性污泥生化特性的可行性。

1.4 蛋白质、NADH及腐殖酸标准样品

配制50 mg/L的蛋白质(牛血清白蛋白BSA)、NADH(还原型辅酶I二钠)及腐殖酸(HA)标准样品,以备PARAFAC分析中的光谱分离与结果校准使用。

2 结果与分析

2.1 SBR反应周期内污泥的生化特性

活性污泥生化特性参数在一个SBR反应周期内的变化情况如图2所示。

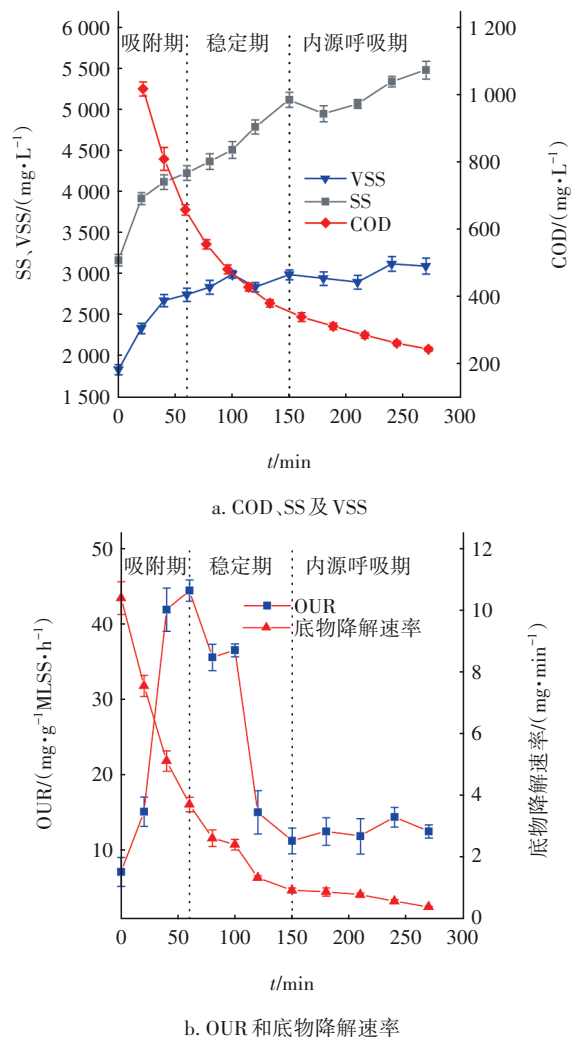


图2 活性污泥生化特性参数在一个SBR反应周期内的变化
Fig.2 Change in biochemical characteristics of activated sludge in one SBR reaction cycle

从图2可以看出,COD、VSS、OUR和底物降解速率在一个SBR反应周期内的变化主要分为吸附期、稳定期和內源呼吸期三个阶段。前60 min为吸附期,此时水中COD快速下降,底物降解速率由最大值持续下降,OUR快速增加到最大值,同时污泥

VSS和SS迅速增加,在这一时期,大分子有机物被快速吸附在细胞膜表面。60~150 min为稳定期,水中COD和底物降解速率的下降速度同时减缓,且VSS增加趋缓,SS的增长速度减缓,OUR也从最大值逐渐下降。在此阶段,大部分有机物由细胞膜转运至细胞内部,参与代谢活动,随着胞内有机物被分解转化为污泥细胞的组成物质,150~270 min为内源呼吸期,VSS保持稳定,底物降解速率继续下降。这是由于底物不足,污泥细胞开始消耗自身有机质与能量。这一过程仍需要消耗氧气,因此OUR不会立即大幅下降,并且由图2(a)可知,VSS在内源呼吸期整体呈上升趋势,说明在该过程中微生物仍然会消耗氧气用于维持自身代谢活动,故导致OUR呈短暂回升的趋势。内源呼吸期SS整体呈上升趋势,这是由于外部底物耗尽后,部分微生物进入内源呼吸状态,细胞自溶和絮体分解可能会释放出更多的小颗粒固体,从而导致SS呈上升趋势。

2.2 活性污泥荧光分析

2.2.1 污泥及其提取物的荧光物质组分

污泥及其提取物的荧光光谱如图3所示。

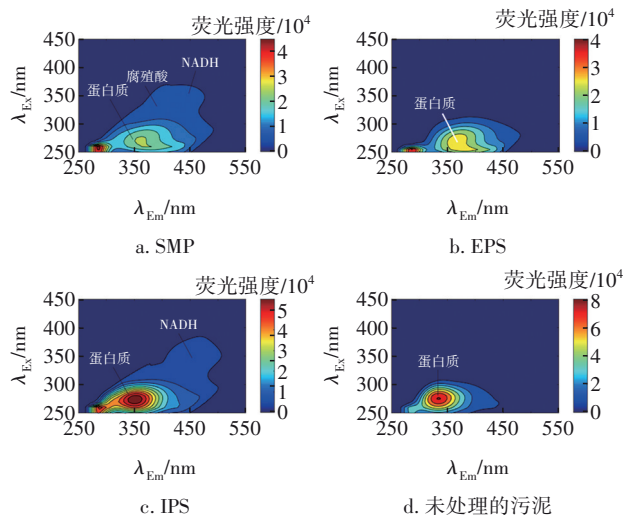


图3 污泥及其提取物的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectroscopy of sludge and its extract

通过对活性污泥、SMP、EPS、IPS的前表面荧光检测可以看到,这些混合液的三维荧光光谱或多或少均可以检测到NADH的荧光。污泥提取物中IPS的NADH含量最高,这是因为其是胞内代谢辅酶,分子质量为663.43 u,因此可以认为Tris加热提取能够释放NADH这类小分子物质^[11]。由于好氧活性污泥的NADH含量较少,蛋白质含量较多,在荧

光光谱中蛋白质荧光峰会把其他物质的荧光峰遮盖;同时,NADH的荧光峰与腐殖酸的荧光峰位置接近,荧光重合严重,因此采用PARAFAC分析对重叠物质进行分离。为了提高分析的准确性,构建了一个包含活性污泥、SMP、EPS和IPS的EEM数据集。

为了提高分离的准确性,还加入了NADH及腐殖酸的标准样品。标准样品的荧光光谱如图4所示。通过PARAFAC分析,识别出了污泥样品EEM光谱中的3种物质,根据激发/发射波长判断在280 nm/340 nm附近的是蛋白质,激发/发射波长在290 nm/450 nm和340 nm/450 nm附近的为NADH物质,激发/发射波长在270 nm/410 nm和335 nm/410 nm附近的为腐殖酸物质。以上结果表明,前表面荧光耦合PARAFAC方法能够有效表征活性污泥中的NADH。

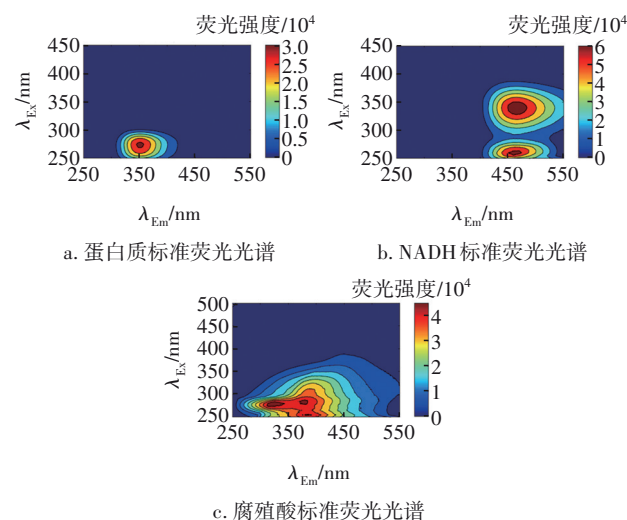


图4 蛋白质、NADH及腐殖酸标准荧光光谱

Fig.4 Standard fluorescence spectroscopy of protein, NADH and humic acid

2.2.2 污泥及其提取物各组分的荧光得分

污泥各组分的荧光物质在一个SBR反应周期内的得分如图5所示。在图5(a)中,蛋白质荧光得分在IPS和未处理的污泥样品中均先上升后下降随后趋于平稳,而在SMP、EPS样品中几乎没有变化;说明微生物先把底物转化为自身蛋白物质后再进入内源呼吸阶段。在图5(b)中,NADH荧光得分在IPS和未处理的污泥样品中均先上升后下降,在SMP、EPS样品中虽有小范围波动但整体变化不大。NADH是一种线粒体辅酶,参与细胞能量代谢活动,其变化趋势与OUR趋势相似,在稳定期和内源呼吸

期与底物降解速率相似。在图 5(c)中,腐殖酸荧光得分除了在 EPS 中整体呈先上升后下降的趋势,在污泥其他组分中几乎无变化。在 SMP、EPS、IPS 样品和未处理的污泥样品中存在 NADH 荧光得分。尽管 NADH 是一种胞内酶^[3],但是在胞外的 SMP 和 EPS 中也检测到部分 NADH 荧光得分,这可能与 SBR 反应周期相对较长、微生物在运行过程中发生凋零死亡有关。在微生物死亡过程中会释放少量的 NADH 进入到 SMP 中。EPS 中检测到的 NADH 或许与其提取方式有关,由于 NADH 分子质量小,其能够透过细胞膜。本研究采用的高速离心提取过程会挤压污泥细胞,从而释放胞内的 NADH 进入到 EPS。NADH 在 IPS 中的荧光得分较高,说明 NADH 主要分布在细胞内部。

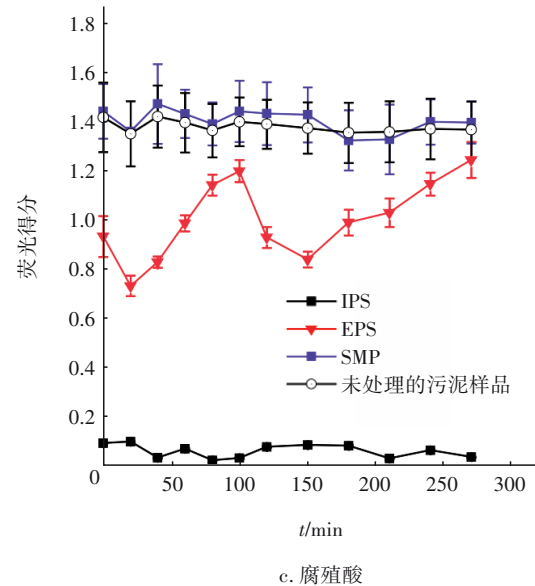
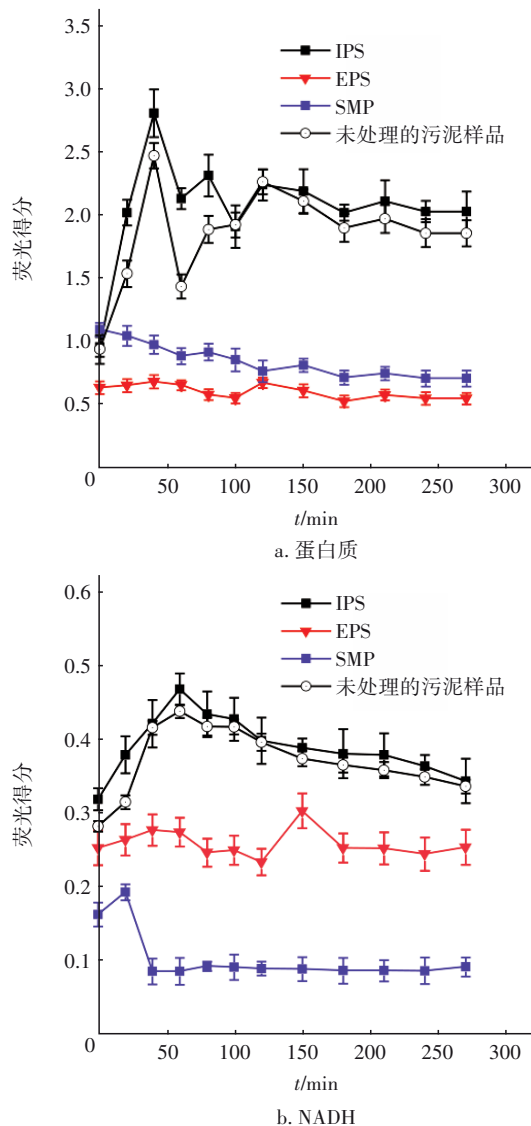


图 5 污泥各组分的荧光物质在一个 SBR 反应周期内的得分
Fig.5 Score of fluorescent substances in each component of sludge in a SBR reaction cycle

值得注意的是,未处理的活性污泥中 NADH 的荧光得分情况与 IPS 十分接近。未处理污泥中 NADH 荧光得分与污泥提取物中 NADH 荧光得分的相关性如图 6 所示。

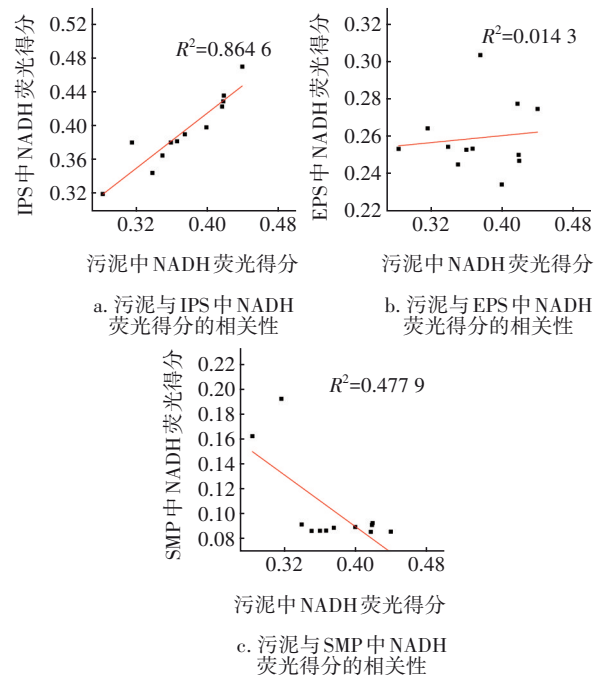


图 6 未处理污泥中 NADH 荧光得分与污泥提取物中 NADH 荧光得分的相关性

Fig.6 Correlation between NADH fluorescence scores in untreated sludge and NADH fluorescence scores in sludge extracts

由图6可知,未处理污泥中NADH荧光得分与IPS、EPS和SMP中NADH荧光得分的相关系数 R^2 分别为0.864 6、0.014 3和0.477 9,这说明FF-EEM有望直接测定活性污泥细胞内的NADH,可以省去提取活性污泥IPS的繁琐过程。污泥中NADH荧光得分与IPS中NADH荧光得分的相关性最好,说明NADH主要存在于污泥细胞内,也验证了使用前表面荧光可以直接检测污泥细胞内的NADH。

2.3 NADH 荧光得分与生化特性参数的相关性

结合上述分析,考察了NADH与OUR、底物降解速率的相关性,发现在整个SBR反应周期内,未处理污泥的NADH荧光得分与OUR的变化趋势相似,两者存在较好的相关性,相关系数为0.682 0,如图7(a)所示。在一个SBR反应周期中的稳定期和内源呼吸期,未处理污泥的NADH荧光得分与底物降解速率的变化趋势相似,两者存在相关性,其相关系数为0.915 3,如图7(b)所示。由此可见,通过FF-EEM解析活性污泥中的NADH荧光可以反映反应器内活性污泥的OUR和底物降解速率。

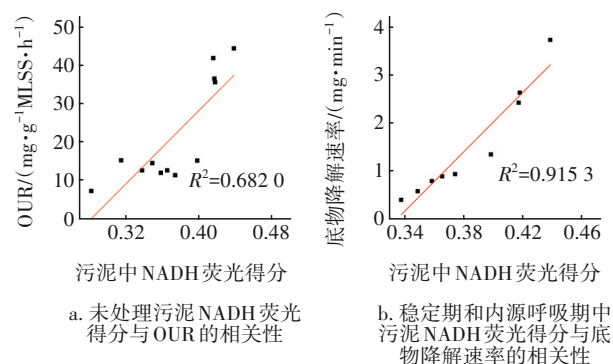
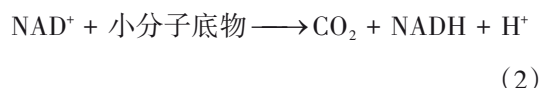


图7 未处理污泥中NADH荧光得分与污泥生化特性参数的相关性

Fig.7 Correlation between NADH fluorescence scores in untreated sludge and sludge biochemical characteristic parameters

NADH存在于污泥细胞线粒体内,在一般的细胞代谢活动中其参与小分子底物和氧气的反应,见式(1)、(2)^[12]。



理论上NADH浓度与底物降解速率和OUR存在相关性。在处理实际生活污水过程中,污泥在整

个代谢过程中都需要氧气,整个SBR反应周期内未处理污泥的NADH荧光得分与OUR的变化趋势相似。由于SBR进水中存在葡萄糖、蛋白质等碳源。在吸附期,葡萄糖等小分子物质直接进入线粒体与NADH反应,蛋白质吸附在细胞膜分解成小分子物质。在此过程中,NADH并未直接参与反应,所以吸附期内底物降解速率与NADH荧光得分变化趋势不一致。在稳定期和内源呼吸期,细胞膜已经把蛋白质完全分解成小分子物质,小分子物质逐步进入线粒体与NADH反应。所以稳定期和内源呼吸期中底物降解速率与NADH荧光得分的变化趋势相似。

以上结果表明,利用FF-EEM直接获取活性污泥的NADH荧光得分来监测污泥中的微生物活性具有可行性。并且,这一方法能够实现污泥生化活性的实时监测,有望在污水处理等领域中得到广泛应用。

3 结论

① FF-EEM结合PARAFAC能够分离活性污泥荧光峰重叠组分,同时可以有效测定SMP、EPS、IPS和活性污泥中的蛋白质、NADH以及腐殖酸等荧光组分。

② NADH在IPS和未处理污泥中的荧光得分相关性较强,两者的相关系数为0.864 6。FF-EEM结合平行因子分析能够对实际运行的活性污泥成分进行快速分析。

③ FF-EEM测定的未处理污泥中NADH荧光与活性污泥特性指标底物降解速率和OUR的相关性均十分良好, R^2 分别为0.915 3和0.682 0,这表明FF-EEM具有较好的污泥活性在线监测潜力,可以通过在线监测活性污泥中NADH荧光来评估污泥活性,从而进一步指导活性污泥工艺的智慧调控。

参考文献:

- [1] 施汉昌,柯细勇,张伟,等.用快速生物活性测定仪测定活性污泥生物活性的研究[J].环境科学,2004,25(1):67-71.
SHI Hanchang, KE Xiyong, ZHANG Wei, et al. Study on the biological activity of activated sludge using a rapid biological activity tester [J]. Environmental Science, 2004, 25(1):67-71(in Chinese).
- [2] 杨文娟,赵剑强.底物降解速率常数的意义及应用

- [J]. 长安大学学报(自然科学版), 2007, 27(3): 107-110.
- YANG Wenjuan, ZHAO Jianqiang. Significance and application of substrate-degradation-rate constant [J]. Journal of Chang'an University (Natural Science Edition), 2007, 27(3):107-110(in Chinese).
- [3] LI W H, SHENG G P, LIU X W, *et al.* Characterizing the extracellular and intracellular fluorescent products of activated sludge in a sequencing batch reactor [J]. Water Research, 2008, 42(12):3173-3181.
- [4] LIU J F, ZAMORA A, CASTILLO M, *et al.* Using front-face fluorescence spectroscopy for prediction of retinol loss in milk during thermal processing[J]. LWT-Food Science & Technology, 2018, 87: 151-157.
- [5] MEHRETIE S, AL RIZA D F, YOSHITO S, *et al.* Classification of raw Ethiopian honeys using front face fluorescence spectra with multivariate analysis[J]. Food Control, 2018, 84: 83-88.
- [6] YU H R, WU Z J, ZHANG X L, *et al.* Characterization of fluorescence foulants on ultrafiltration membrane using front-face excitation-emission matrix (FF-EEM) spectroscopy: fouling evolution and mechanism analysis [J]. Water Research, 2019, 148: 546-555.
- [7] YU H R, QU F S, WU Z J, *et al.* Front-face fluorescence excitation-emission matrix (FF-EEM) for direct analysis of flocculated suspension without sample preparation in coagulation-ultrafiltration for wastewater reclamation [J]. Water Research, 2020, 187: 116452.
- [8] WOS M, POLLARD P. Sensitive and meaningful measures of bacterial metabolic activity using NADH fluorescence [J]. Water Research, 2006, 40 (10) : 2084-2092.
- [9] RODER B, ANDREW D, EUGENE W, *et al.* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [M]. 23rd ed. Washington D. C. : American Public Health Association, 2017:114-653.
- [10] XIONG Q R, SONG Y M, SHEN J, *et al.* Fluorescence fingerprint as an indicator to identify urban non-point sources in urban river during rainfall period [J]. Environmental Research, 2024, 245: 118009.
- [11] YU H R, LI Y M, YANG H Y, *et al.* Characterization of activated sludge in wastewater treatment processes using front-face excitation-emission matrix (FF-EEM) fluorescence spectroscopy [J]. Environmental Science: Water Research & Technology, 2022,8(10): 245-256.
- [12] 朱圣庚, 徐长法, 王镜岩, 等. 生物化学[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2016:50-75.
- ZHU Shengeng, XU Changfa, WANG Jingyan, *et al.* Biochemistry [M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2016:50-75(in Chinese).

作者简介:李坦(2001-),女,河南新乡人,硕士,主要研究方向为污水处理数学模拟。

E-mail:litan010305@163.com

收稿日期:2024-10-11

修回日期:2024-11-28

(编辑:任莹莹)

加强生态保护和修复,
提升生态系统多样性、稳定性、持续性